第 37 卷第 11 期
2017 年 6 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol.37,No.11
Jun.,2017

DOI: 10.5846/stxb201603220512
杨亚东,张明才,胡君蔚,张凯,胡跃高,曾昭海.施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响.生态学报,2017,37(11):3636-3646.
Yang Y D, Zhang M C, Hu J W, Zhang K, Hu Y G, Zeng Z H.Effects of nitrogen fertilizer application on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a North China agricultural soil.Acta Ecologica Sinica,2017,37(11):3636-3646.

施氮肥对华北平原土壤氨氧化细菌和古菌数量及群落结构的影响

杨亚东,张明才,胡君蔚,张 凯,胡跃高,曾昭海*
中国农业大学农学院, 北京 100193

摘要:利用荧光定量 PCR、末端限制性片段长度多样性(T-RFLP)和基因克隆文库技术,比较了 4 种施氮水平(不施氮肥,0 kg N/hm^2,CK;施低水平氮肥,75 kg N/hm^2,N1;施中水平氮肥,150 kg N/hm^2,N2;施高水平氮肥,225 kg N/hm^2,N3)下华北平原地区小麦季表层(0—20 cm)土壤总细菌、氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)的丰度和群落结构。结果表明,土壤总细菌、AOB 和 AOA 数量分别在每克干土 5.74×10^9—7.50×10^9、8.89×10^6—2.66×10^7 和 3.83×10^8—7.78×10^8 之间。不同施氮量土壤 AOA 数量均高于 AOB 数量,AOA/AOB 值在 81.72—14.38 之间。增施氮肥显著显著提高 AOB 数量(P<0.05),对总细菌和 AOA 数量的影响不显著(P>0.05)。与 CK 相比,处理 N1、N2 和 N3 中 AOB 数量分别提高了 0.64、1.50 和 1.99 倍。增施氮肥显著改变了 AOB 和 AOA 的群落结构,且不同施氮量处理中 AOB 群落结构差异更大。系统进化分析显示,施氮肥小麦土壤 AOB 主要为 *Nitrosospira* 属类群,分布在 Cluster 3 的两个分支中;AOA 分布在 Cluster S 的4 个分支中。相关性分析显示,AOB 数量与全氮和铵态氮含量呈显著正相关关系,与土壤 pH 和碳氮比呈显著负相关关系(P<0.05);AOA 数量与硝态氮含量和土壤 pH 呈显著正相关关系,与铵态氮含量呈显著负相关关系(P<0.05)。研究结果表明:增施氮肥可显著改变华北平原地区碱性土壤 AOB 数量与群落结构,该地区小麦土壤中 AOB 比 AOA 对氮肥响应更敏感。

关键词:氮肥;氨氧化细菌;氨氧化古菌;丰度;群落结构;末端限制性片段长度多样性

Effects of nitrogen fertilizer application on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a North China agricultural soil

YANG Yadong, ZHANG Mingcai, HU Junwei, ZHANG Kai, HU Yuegao, ZENG Zhaohai*
College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, *China*

Abstract: The abundance and community structure of total bacteria ammonia oxidizing bacteria, and archaea were investigated by real-time PCR, T-RFLP, and cloning library approaches in a wheat field under different N fertilization rates (no N fertilization, 0 kg N/hm^2, CK; low N fertilization rate, 75 kg N/hm^2, N1; moderate N fertilization rate, 150 kg N/hm^2, N2; high N fertilization rate, 225 kg N/hm^2, N3) in North China. The population sizes of total bacteria, AOB and AOA were 5.74×10^9—7.50×10^9, 8.89×10^6—2.66×10^7 and 3.83×10^8—7.78×10^8 copies/g dry soil, respectively. The population numbers of AOA were higher than that of AOB in all treatments, with AOA to AOB ratios ranged from 81.72 to 14.38. Significant higher numbers for AOB were detected for the high level of N fertilization soil (P<0.05), but not in the population of total bacteria and AOA. The population numbers of AOB observed in N1, N2 and N3 were 1.64, 2.50 and 2.99 times greater than that in the CK treatment, respectively. The N fertilization rates significantly changed the

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201503121-11); 河北省科技攻关项目(14227008D)
收稿日期:2016-03-22; **网络出版日期**:2017-02-22

*通讯作者 Corresponding author.E-mail: zengzhaohai@ cau.edu.cn

communities of both AOB and AOA, and more variation was observed in the community of AOB. Phylogenetic results showed that the majority AOB sequences fell into two branches of Cluster 3, affiliated with *Nitrosospira* species, and all AOA sequences fell within four branches in Cluster S. Significant positive correlations were observed among the population sizes of AOB to total nitrogen and ammonium, and the population sizes of AOA to soil pH and nitrate (P<0.05). Significant negative correlations were observed among the population sizes of AOB to soil pH and C/N ratio, and the population sizes of AOA to ammonium (P<0.05). These results demonstrated that AOB were more sensitive than AOA to N fertilization in alkaline wheat fields in North China.

Key Words: nitrogen fertilizer; ammonia oxidizing bacteria (AOB); ammonia oxidizing archaea (AOA); abundance; community structure; terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

硝化作用是农田氮素循环的重要环节,也是土壤氮素转化的关键过程[1]。氨氧化作用是硝化作用的第一步反应,也是整个过程的限速步骤[2]。在很长一段时间内,来自变形菌纲的氨氧化细菌(AOB)[2-3]被认为是其唯一承担者,直到氨氧化古菌(AOA)[4-5]的发现,才证实了氨氧化过程是由 AOB 和 AOA 两类微生物共同承担。Leininger 等[6]首次报道了原始土壤和农业土壤中 AOA 在数量上远高于 AOB,再次证实了 AOA 是参与土壤环境中氨氧化过程的重要微生物。

前人的研究表明,AOB 和 AOA 数量和群落组成受氨的有效性[3]、温度[7]、土壤 pH[8]、土壤含水量[9]和施肥措施[10]等因素影响。Zhou 等[11]研究表明施用氮肥可以提高 AOB 数量,而施用有机肥则增加了 AOA 多样性;张苗苗等[12]研究显示长期施用氮肥降低了 AOB 多样性,显著提高了 AOA 数量;Di 等[13]发现草地土壤中 AOA 数量远高于 AOB,而施用动物尿液(富含 NH_3)显著促进了 AOB 数量的增加;Chen 等[14]研究结果也证实了施肥对 AOA 数量影响强于对 AOB 的影响,且影响 AOA 群落组成;Long 等[15]研究却发现施氮肥对 AOB 和 AOA 数量影响不显著;关于施氮水平对 AOB 和 AOA 的影响研究方面,Zhong 等[16]研究了温室蔬菜不同施氮量对 AOB 和 AOA 的影响,结果表明土壤施氮量增加后,AOB 和 AOA 的数量均下降,且增施氮肥对 AOB 群落结构的影响强于对 AOA 群落结构的影响。施用氮肥对土壤 AOB 和 AOA 的影响因氮肥类型和施氮量水平不同存在显著差异,而施氮水平对华北地区小麦生产系统土壤 AOB 和 AOA 数量和群落组成的影响仍不清楚,亟待研究。

华北平原是我国重要的粮食主产区,长期小麦-玉米集约种植模式需要大量的肥水投入,带来温室气体(N_2O、NO)排放和地下水污染等问题[10],给区域造成很大的生态压力。研究不同施氮水平对土壤 AOB 和 AOA 数量和群落结构的影响可以进一步明确氮肥转化的微生物机制。本研究以连续 5a 的田间定位试验为基础,以华北平原小麦季土壤为研究对象,采用荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, q-PCR)、末端限制性片段长度多样性(T-RFLP)和基因克隆文库技术,比较了 4 种施氮水平下小麦土壤 AOB 和 AOA 数量和群落组成的差异。旨在阐明华北平原小麦土壤中 AOB 和 AOA 对氮肥的响应机制,为土壤科学施肥、维护土壤微生物多样性和农业可持续发展等提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计和土壤样品采集

试验地位于河北省沧州市吴桥县中国农业大学吴桥实验站(37°37′N,116°22′E)。该地区属暖温带半湿润大陆性季风气候,土壤类型为中壤质潮土,成土母质为河流冲积物。年平均气温 12.9℃,全年积温(≥0℃)为 4,826℃,无霜期 201 d,降雨量为 562 mm,日照时数 2724 h。氮肥梯度试验起始于 2010 年,种植模式为冬小麦-夏玉米一年两熟,冬小麦季施氮量设置 4 个梯度,分别为不施氮肥(0 kg N/hm^2, CK),施低水平氮肥(75 kg N/hm^2, N1),施中水平氮肥(150 kg N/hm^2, N2)和施高水平氮肥(225 kg N/hm^2, N3),磷肥施用量

90 kg P_2O_5/hm², 钾肥施用量 90 kg K_2O/hm²。氮肥、磷肥和钾肥分别为尿素、磷酸二氢钙和硫酸钾,肥料均基施。小区面积为 24 m²,重复 3 次,完全随机区组排列。

土壤样品采集于 2015 年 6 月冬小麦收获后,采用对角线五点采样法,每个小区采集 5 个点 0—20 cm 土壤。同一处理的土壤样品混合成一个样品,除去碎石、根系及其他杂物,过 2 mm 筛,将土样分成两部分,一部分迅速用锡箔纸包裹后液氮冷冻,用冰盒保存带回实验室后-80℃保存,用于 DNA 提取及后续分析;另一部分装入自封袋后带回实验室,用鲜土样测定铵态氮和硝态氮含量,剩余土壤自然风干后测定土壤 pH、有机质和全氮含量。

1.2 土壤理化性质测定

土壤 pH 采用电位法(水:土=2.5:1)测定,土壤全氮采用浓硫酸-蒸馏滴定法测定,土壤铵态氮和硝态氮用 2 mol/L KCl 溶液浸提新鲜土样后,采用流动分析仪测定(SAN++, Skalar, Holland),土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定[17]。

1.3 土壤总 DNA 提取

取 0.2—0.5 g 冷冻土壤样品,用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit(Omega,USA)试剂盒提取土壤总 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 完整性,用 NANO Quant(Tecan,Switzerland)测定提取 DNA 浓度和纯度。

1.4 总细菌 16S rDNA、AOB 和 AOA *amoA* 基因的扩增与荧光定量 PCR 分析

分别用引物 BACT1369F/PROK1541R、*amoA*-1F/*amoA*-2R 和 Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R 扩增细菌 16S rDNA、AOB 和 AOA *amoA* 基因(表 1)。PCR 体系为 50 μL,分别含 10× Buffer 5.0 μL,dNTP(各 2.5 μmol/L)4.0 μL,上下游引物(10 μM)各 1.0 μL,DNA 模板(1—10 ng)1 μL,r*Taq*(5 U/μL)1.0 μL,最后用 ddH_2O 补至 50.0 μL。PCR 程序:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。回收 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体,转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中,经 Amp^+、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板筛选阳性克隆,测序分析。

标准曲线的制作:提取测序正确的细菌 16S rDNA、AOB 和 AOA *amoA* 基因的阳性克隆质粒,用 NANO Quant(Tecan,Switzerland)测定质粒浓度,按 10 倍梯度稀释质粒至 10^3—10^8 拷贝数/微升,-80℃保存,用于制备标准曲线。

荧光定量 PCR 在 ABI 7300(ABI,USA)上进行,反应体系为 20 μL,分别含 SYBR® *Premix Ex Taq* Ⅱ(Thi RNaseH Plus)10.0 μL,上下游引物各 0.8 μL(10 μM),ROX Reference Dye(50x)0.4 μL,DNA 模板 2.0 μL(1—10 ng),用ddH_2O补至 20.0 μL。PCR 引物及程序如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物及反应条件

Table 1 Primers and PCR profiles used for real-time PCR amplification

靶标 Target	引物名称 Primer	序列(5′—3′) Sequence (5′—3′)	片段长度 Length (bp)	荧光定量 PCR 程序 Real-time PCR profiles	参考文献 References
细菌 Bacteria	BACT1369F PROK1541R	5′-CGGTGAATACGTTCYCGG-3′ 5′-AAGGAGGTGATCCRGCCG CA-3′	173	95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 1 min, 35 cycles	[17]
氨氧化细菌 AOB	*amoA*-1F *amoA*-2R	5′-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3′ 5′-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3′	491	95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 55℃ 30 s, 68℃ 40 s, 40 cycles	[17]
氨氧化古菌 AOA	Arch-*amoA*F Arch-*amoA*R	5′-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3′ 5′-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3′	635	95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 55℃ 30s, 68℃ 40 s, 40 cycles	[17].

Y 表示 C 或 T;R 表示 A 或 G;K 表示 G 或 T;S 表示 C 或 G;AOB:氨氧化细菌 Ammonia oxidizing bacteria;AOA: 氨氧化古菌 Ammonia oxidizing archaea

1.5 末端限制性片段长度多样性分析

对 AOB 和 AOA 进行 T-RFLP 分析,选用 *amoA*-1F/*amoA*-2R 和 Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R 扩增 AOB 和 AOA *amoA* 基因,其中引物 *amoA*-1F 和 Arch-*amoA*F 的 5′端用 6-FAM 进行荧光标记,PCR 体系和程序同 1.4 所示。回收 PCR 产物后,用限制性内切酶 *Rsa* Ⅰ(Taraka,大连)分别酶切 AOB 和 AOA *amoA* 基因。反应体系为 20 μL,分别含 10× T Buffer 2 μL,0.1% BSA 2 μL,*Rsa* Ⅰ(10 U/μL)1 μL,PCR 产物 DNA 10 μL,最后用 ddH_2

O 补至 20.0 μL。37℃水浴酶切 3 h,重复 3 次,用乙醇沉淀法纯化酶切产物,最后将 3 个重复混匀成一个样品。取回收的酶切产物 0.3 μL、分子量内标(GS500LIZ)0.5 μL 和甲酰胺 9.5 μL 混合均匀后加入 96 孔板中,95℃变性 5 min,4℃冷却后离心,1× Buffer 缓冲液上机检测,采用 ABI 3730(ABI,USA)测序仪测定分析。用 GeneMarker V 2.2(ABI,USA)分析电泳图中各峰的片段长度和峰面积,忽略长度小于 50 bp 和峰面积小于 1% 的峰。将峰的信号强度标准化,每种末端限制性片段(T-RF)类型的相对丰度用百分比形式表示。

1.6　克隆和测序

将 4 个土壤样品的 DNA 混合后做模板,采用 *amoA*-1F/*amoA*-2R 和 Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R 扩增 AOB 和 AOA *amoA* 基因,体系和扩增条件同 1.4 所示,引物不添加荧光标记。扩增产物回收后,分别连接至 pMD18-T 载体(Taraka,大连)上,转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中,经筛选后分别选取了 53 和 56 个阳性克隆进行测序分析。测序结果经分析比对后,将同源性≥97%的序列归为一类,选一条用于构建系统发育树。将具有代表性的 AOB 和 AOA *amoA* 基因序列提交至 NCBI 数据库中,获 AOB 和 AOA 登录号分别为 KU365731—KU365744 和 KU365745—KU365753。

1.7　数据分析

数据的方差分析和相关性分析用 SPSS 20.0 软件(SPSS 20.0 for Windows,SPSS Inc,USA)完成;土壤总细菌、AOB 和 AOA 数量的数据取对数后,用 SigmaPlot 12.5 软件制图;测序核苷酸序列用 DNAMAN 6.0 软件分析,并用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树,选用邻-接法(Neighbour-Joining);用末端限制性片段(T-RF)的长度和相对含量数据进行主成分分析,由 Canoco 5.0 软件完成。

2　结果

2.1　土壤基础理化性质

不同施氮量 0—20 cm 土层土壤中除有机质含量差异不显著(14.96—15.49 g/kg,$P>0.05$)外,其他理化性质存在显著差异(表 2)。随施氮量增加,土壤 pH 呈显著下降趋势(8.46—8.29),依次为 N3<N2<N1<CK($P<0.05$)。增施氮肥提高了土壤全氮(0.86—1.04 g/kg)、铵态氮(0.92—1.54 mg/kg)和硝态氮含量(3.76—24.29 mg/kg)。N3 和 N2 土壤全氮含量显著高于 N1 和 CK($P<0.05$);N3 土壤铵态氮含量显著高于 N2、N1 和 CK($P<0.05$);不同施氮处理土壤硝态氮含量均存在显著差异,依次为 CK<N1<N2<N3($P<0.05$)。随着施氮量增加,土壤碳氮比下降,CK 显著高于 N2 和 N3,N1 显著高于 N3($P<0.05$)。

表 2　不同施氮处理土壤基础理化性质

Table 2　Soil chemical properties of different N fertilizer application rate treatments

处理 Treatment	pH	有机质 Total organic matter/(g/kg)	全氮含量 Total Nitrogen/(g/kg)	铵态氮 NH_4^+-N/(mg/kg)	硝态氮 NO_3^--N/(mg/kg)	碳氮比 C/N
不施氮肥 No N fertilization, CK	8.46±0.01 a	14.96±0.87 a	0.86±0.06 b	0.92±0.09 c	3.76±0.44 d	10.14±0.73 a
施低水平氮肥 Low N fertilization rate, N1	8.38±0.01 b	15.18±.050 a	0.91±0.01 b	1.24±0.12 b	6.36±0.23 c	9.65±0.29 ab
施中水平氮肥 Moderate N fertilization rate, N2	8.34±0.02 c	15.25±0.26 a	0.99±0.02 a	1.22±0.15 b	7.92±0.22 b	8.95±0.05 bc
施高水平氮肥 High N fertilization rate, N3	8.29±0.01 d	15.49±0.41 a	1.04±0.02 a	1.54±0.08 a	24.29±0.69 a	8.67±0.37 c

不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$),数据为平均值±标准差,$n=3$;CK 0 kg N/hm^2,N1 75 kg N/hm^2,N2 150 kg N/hm^2,N3 225 kg N/hm^2

2.2　土壤总细菌、AOB 和 AOA 的数量

以 16S rDNA 和 *amoA* 基因为靶标,用荧光定量 PCR 测定土壤总细菌、AOB 和 AOA 数量。结果显示,不同施氮处理土壤总细菌数量在 5.74×10^9—7.50×10^9拷贝数/g 干土,处理间差异不显著($P>0.05$,图 1)。不同

施氮处理土壤 AOB 数量在 8.89×10^6—2.66×10^7拷贝数/g 干土,不同施氮处理 AOB 数量均差异显著,随施氮量增加,AOB 数量显著增加($P<0.05$)。与 CK 相比,N1、N2、N3 中 AOB 数量分别提高了 64%、150%和 199%。AOA 数量在 3.83×10^8—7.78×10^8拷贝数/g 干土,CK、N1 和 N2 中 AOA 数量显著高于 N3($P<0.05$,图 2)。相关性分析结果显示,总细菌数量仅与硝态氮($r=-0.582$,$n=12$,$P<0.05$)呈显著负相关关系。AOB 数量与全氮($r=0.838$,$n=12$,$P<0.01$)和铵态氮($r=0.597$,$n=12$,$P<0.05$)呈显著正相关关系,与土壤 pH($r=-0.859$,$n=12$,$P<0.01$)和碳氮比($r=-0.784$,$n=12$,$P<0.01$)呈显著负相关关系。AOA 数量与硝态氮($r=0.926$,$n=12$,$P<0.01$)和土壤 pH($r=0.594$,$n=12$,$P<0.05$)呈显著正相关关系,与铵态氮($r=-0.717$,$n=12$,$P<0.05$)呈显著负相关关系。

不同施氮处理土壤 AOA 数量均显著高于 AOB 数量,AOA 与 AOB 数量比值在 81.72—14.38 之间,随施氮量增加,AOA 与 AOB 数量比值呈下降趋势。荧光定量结果表明,增施氮肥能显著提高小麦土壤 AOB 数量,对总细菌和 AOA 数量影响不显著。此外,总细菌、AOB 和 AOA 数量与土壤各环境因子的相关性存在明显差异。

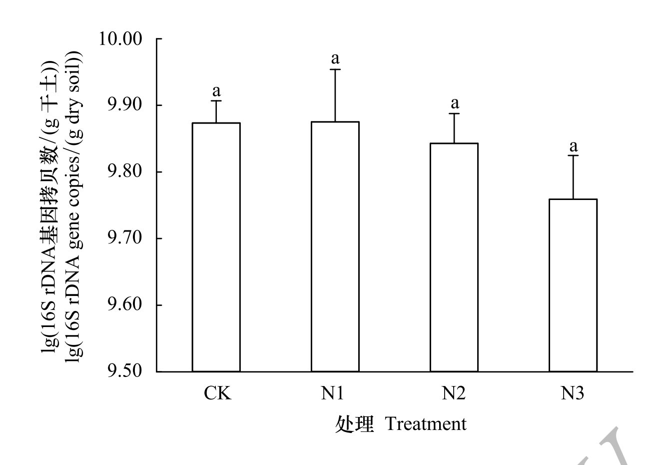


图 1 不同施氮处理细菌 16S rDNA 基因拷贝数

Fig.1 Abundance of bacteria 16S rDNA gene under different N fertilizer application rate treatments

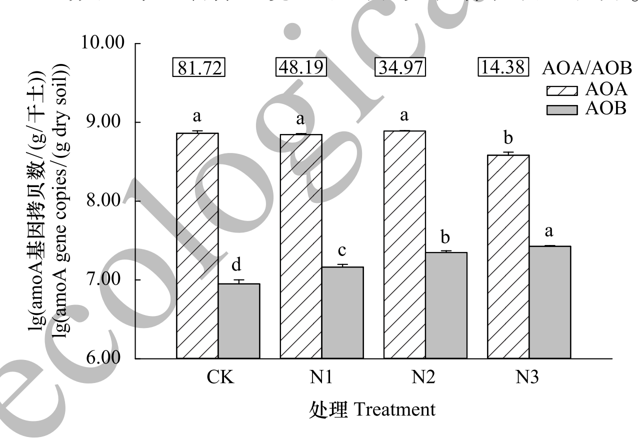


图 2 不同施氮处理氨氧化细菌和氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数

Fig.2 Abundance of ammonia oxidizing bacteria and archeae *amoA* genes under different N fertilizer application rate treatments

2.3 AOB 和 AOA 的群落结构

选用限制性内切酶 *Rsa* I 分别对 AOB 和 AOA 进行 T-RFLP 分析。4 个处理共得到 10 个 AOB 的 T-RF 片段长度(图 3a),其中 96、210、251、244、255、270、274 和 380 bp 在 4 个处理中均存在,63 bp 只存在于 CK、N1 和 N2 中,248 bp 只存在于 N2 和 N3 中。长度为 210、251、255、274 和 380 bp 的 T-RFs 为主要片段,分别占总片段的 3.91%—11.38%、26.60%—29.71%、26.97%—39.49%、6.50%—11.20% 和 11.87%—17.76%,合计占总片段的 92.74%—93.34%。这些片段所代表的 AOB 在土壤中占优势,其中 251、255 和 380 bp 长度所占比例均超过 10%,为占绝对优势的 3 个 AOB 类群。

4 个处理共得到 11 个 AOA 的 T-RF 片段长度(图 3b),其中 60、98、196、259、261、263 和 299 bp 在 4 个处理中均存在,63 和 65 bp 只存在于 CK、N1 和 N2 中,256 bp 只存在于 N1、N2 和 N3 中,261 bp 只存在于 CK 中,265 bp 只存在于 N1 和 N2 中。长度为 60、196、256、259 和 299 bp 的 T-RFs 为主要片段,分别占总片段的 53.26%—64.76%、7.79%—12.88%、12.26%—16.17%、2.94%—10.45% 和 2.46%—5.34%,合计占总片段的 85.13%—94.91%。这些片段所代表的 AOA 在土壤中占优势,其中 60 和 256 bp 长度所占比例均超过 10%,为占绝对优势的 2 个 AOA 类群。

2.4 AOB 和 AOA *amoA* 基因序列的系统发育树构建

经测序比对分析后,分别得到 14 和 9 个 AOB 和 AOA *amoA* 基因操作分类单元(operational taxonomic unit,OTU)。AOB *amoA* 基因序列两两同源性在 69.92%—96.54%之间,14 条序列的同源性为 91.77%;AOA

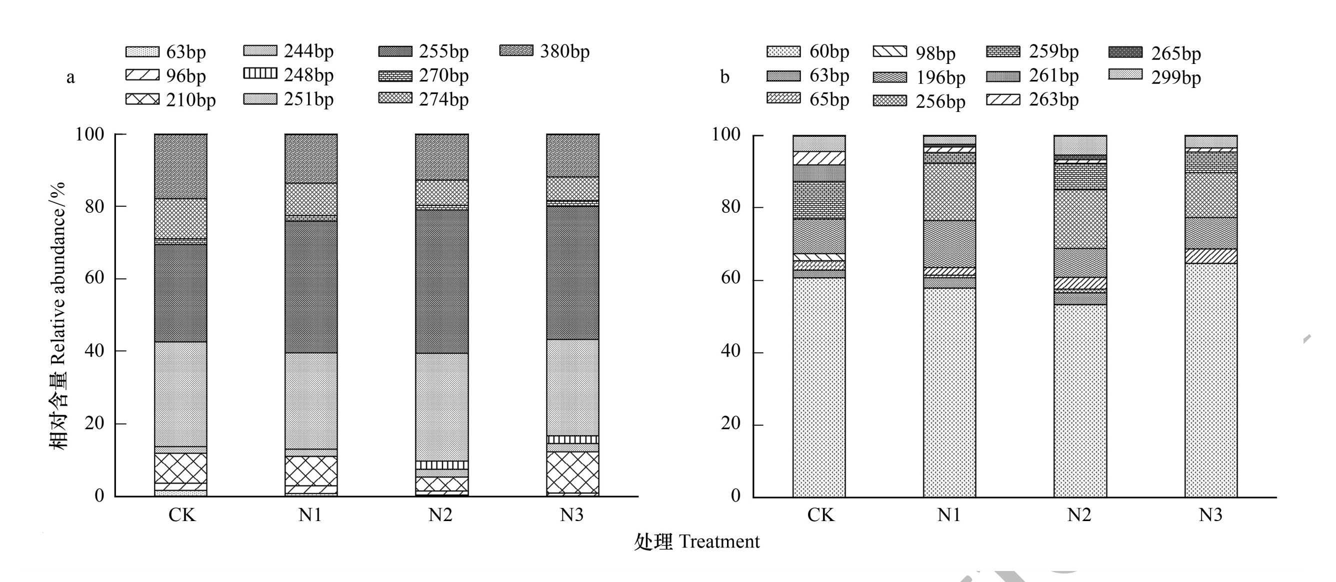


图 3　不同施氮处理氨氧化细菌(a)和古菌(b)*amoA* 基因 T-RFs 的相对丰度

Fig.3　Relative abundance of T-RFs of ammonia oxidizing bacteria (a) and archaea (b) *amoA* genes restricted by *Rsa* I under different N fertilizer application rate treatments

amoA 基因序列两两同源性在 77.48%—96.22%之间,9 条序列的同源性为 87.44%。系统进化分析结果显示:AOB *amoA*基因序列聚类在两个 Cluster 中,其中,AOB 12 聚类在 *N. communis* Cluster 中,其余 AOB 都聚类在 Cluster 3 中。聚类在 Cluster 3 中的 AOB 分布在 Cluster 3a 和 Cluster 3b 两个分支中,除片段长度为 210 bp 的 T-RF 聚类在 Cluster 3b 外,其他片段长度 T-FRs 均聚类于 Cluster 3a(图 4);所有 AOA *amoA* 基因序列都聚类在 Cluster S 中,分布在 4 个分支中。其中,196 bp T-RF 聚类在分支Ⅰ和Ⅲ中,60 bp T-RF 聚类在分支Ⅱ中,63 bp T-RF 聚类在分支Ⅱ和Ⅲ中,299 bp T-RF 聚类在分支Ⅰ和Ⅳ中(图 5)。

2.5　主成分分析

基于 T-RFs 的主成分分析(PCA)结果显示,第一、二排序轴是主成分轴。对 AOB 群落变异的解释量达到 95.16%,其中轴 1 和轴 2 分别为 76.81%和 18.35%(图 6a);对 AOA 群落变异的解释量达到 94.44%,其中轴 1 和轴 2 分别为 77.22%和 17.22%(图 6b)。处理 CK、N1、N2 和 N3 的 AOB 都明显分开,分布在 4 个象限中;而 4 个处理的 AOA 群落结构差异弱于 AOB,其中,N1 和 N2 聚在一起(第三象限),与 CK 和 N3 明显分开。PCA 结果表明:施氮量显著影响小麦土壤 AOB 和 AOA 的群落结构,且不同施氮处理的 AOB 群落结构差异强于 AOA。

3　讨论

3.1　施氮肥对小麦土壤总细菌、AOB 和 AOA 数量的影响

土壤总细菌数量是反映土壤总微生物活性的一个重要参数。本研究中土壤总细菌 16S rDNA 基因在 5.74×10^9—7.50×10^9拷贝数/g 干土之间,与 Shen 等[17]研究发现细菌数量在 3.39×10^9—1.23×10^{10}拷贝数/g 干土之间的结果相似,相较于 He 等[8]在水稻土壤中细菌数量 10^{10}拷贝数/g 干土数量级低,且总细菌数量仅与硝态氮呈显著负相关关系。小麦与水稻土壤类型和理化性质差异可能是引起总细菌数量差异的主要原因。此外,本研究不同施氮水平土壤总细菌数量差异不显著,与 He 等[8]和 Shen 等[17]研究结果一致,表明土壤总细菌数量对施氮肥响应不明显。

AOB 和 AOA 是土壤氮循环的关键微生物,直接影响着土壤健康、肥力状况和生产力等。本研究不同施氮量处理 AOA 数量均高于 AOB,AOA 与 AOB 数量比值在 81.72—14.38 之间,与 Leininger 等[6]、He 等[8]、Shen 等[17]和 Jia 等[18]研究结果相符,进一步证实了碱性土壤更适合 AOB。AOB 数量在 8.89×10^6—2.66×10^7

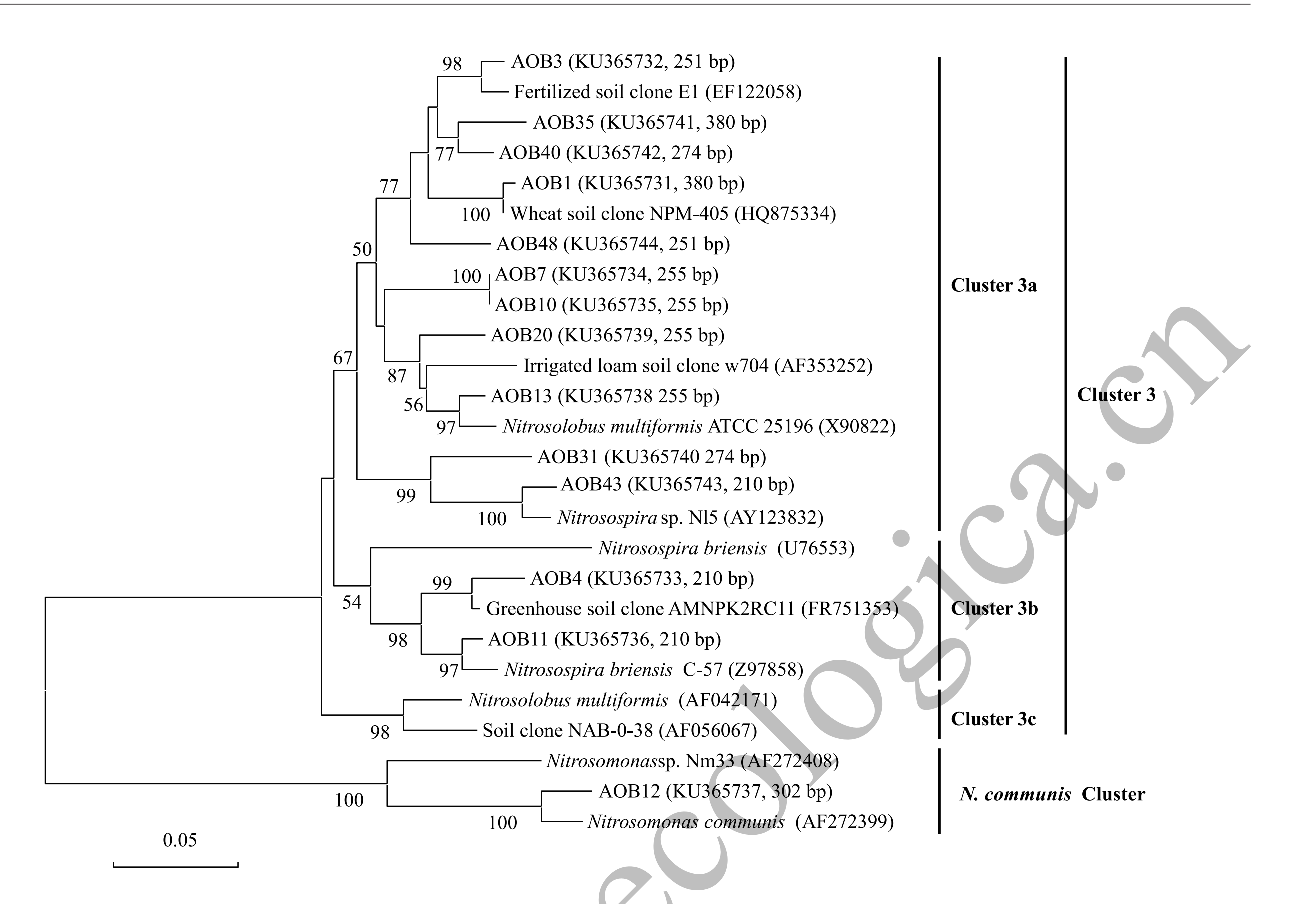


图 4 氨氧化细菌 *amoA* 基因系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of ammonia oxidizing bacteria *amoA* gene sequences

拷贝数/g 干土,与 He 等[8]、Chen 等[14]和 Wessén 等[19]研究中 AOB 数量级一致,比 Shen 等[16]、Wang 等[20]和 Yao 等[21]研究中 AOB 高出 2—3 个数量级。AOA 数量在 3.83×10^8—7.78×10^8拷贝数/g 干土,与 Chen 等[14]研究中水稻土壤 AOA 数量级一致,比 He 等[8]、Shen 等[17]和 Wang 等[20]研究中 AOA 数量高出 1—2 个数量级。此外,本研究中 AOB 数量随施氮量增加而显著增加,而 AOA 数量差异不显著,与 Di 等[22]研究发现高氮草地土壤中 AOB 数量随施氮量增加而增加一致,而与 Zhong 等[16]研究表明随着施氮量增加,AOB 和 AOA 数量均下降不同。

He 等[10]研究表明土壤 pH 是造成 AOB 和 AOA 数量差异的主要原因,而 Chen 等[14]认为肥料是引起 AOA 数量变化的主要原因,土壤 pH 和肥料均对 AOB 数量产生影响;Di 等[22]认为硝态氮含量是引起 AOB 数量增加的原因;但 Zhong 等[22]在温室条件下却得到相反的结果,认为硝态氮含量是导致 AOB 数量下降的原因,而 AOA 数量下降则可能是由于土壤 pH 降低造成。本研究中 AOB 数量与土壤 pH 呈极显著负相关关系,与全氮含量呈极显著正相关关系,AOB 数量上升可能是土壤 pH 下降和肥料作为底物导致,与 Di 等[22]结果一致。AOA 数量与土壤 pH 呈显著正相关关系,而与全氮含量相关性不显著,AOA 数量的降低,可能是由施氮量增加引起的土壤 pH 下降造成,而非氮肥作为底物造成,与 He 等[8]和 Chen 等[14]研究结果相符。不同施氮处理土壤 pH 均呈碱性,且长期增施氮肥引起土壤 pH 降低导致了 AOA 数量下降和 AOB 数量上升,与 Shen 等[23]报道的 AOB 适合在中性至碱性、氮素含量丰富的土壤中生存,而 AOA 适合在酸性土壤中生存的结果一致。本研究中不同施氮处理 AOA 在数量上占优势,随着施氮量增加,AOB 数量显著上升,AOA 数量上的优势减弱,表明 AOB 对氮肥更敏感,高氮条件下土壤中氨氧化过程的主要承担者可能是 AOB 而非 AOA,与 Jia 等[18]和 Shen 等[23]结论一致。

3.2 施氮肥对小麦土壤 AOB 和 AOA 群落组成的影响

本研究用限制性内切酶 *Rsa* Ⅰ 酶切 AOB 和 AOA *amoA* 基因经后测序分别得到了 10 和 11 个 T-RFs,与

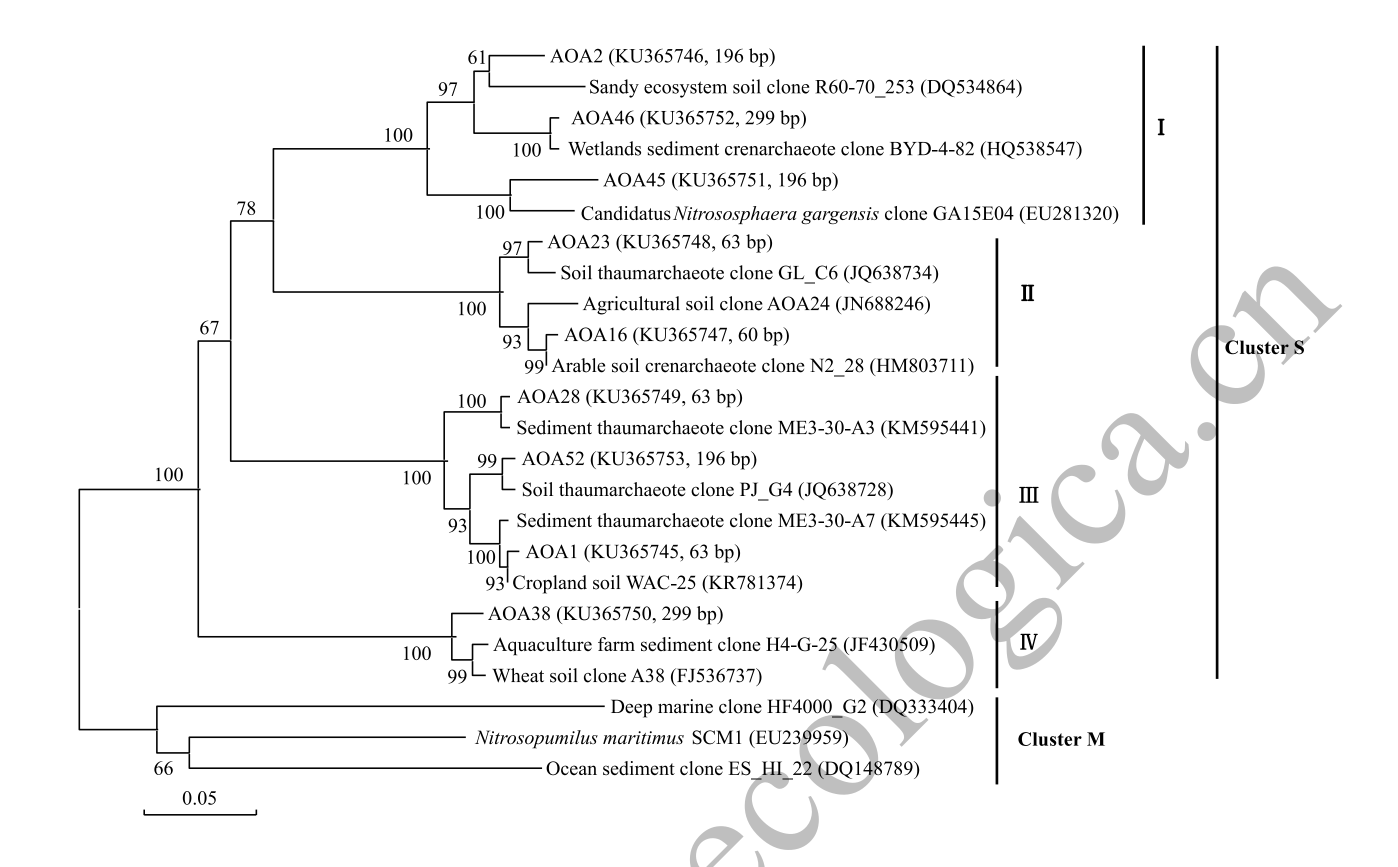


图 5　氨氧化古菌 *amoA* 基因系统发育树分析

Fig.5　Phylogenetic tree of ammonia oxidizing archaea *amoA* gene sequences

Zhou 等[11]研究紫土中 AOB 用 *Acc* Ⅱ酶切得到 11 个 T-RFs,莫旭华等[24]研究小麦土壤中 AOA 用 *Afa* Ⅰ酶切得到 10 个 T-RFs 的结果一致;但 Chen 等[25]研究发现草原土壤中 AOB 用 *Mob* Ⅰ酶切后仅得到 4 个 T-RFs, Chen 等[14]研究发现水稻土壤中 AOA 用 *Mob* Ⅰ酶切后仅得到 4 个 T-RFs。T-RFs 数量不同,可能是选用内切酶不同导致,也可能是由于土壤类型差异引起。

不同施氮处理中,T-RF 长度为 63、96、274、380、248 和 255 bp 的 AOB 类群所占比例差异较大,且随施氮量的增加表现出不同的变化趋势;而 T-RF 长度为 256 和 265 bp 的 AOA 类群差异较大,且 4 个处理中 AOA 均含有 2 个绝对优势的类群(>10%),表明小麦土壤中 AOB 的群落组成受施氮量的影响较大,而 AOA 具有较稳定性的群落结构,与 Shen 等[17]碱性土壤条件下得到的结果一致,而与 He 等[8]、Chen 等[14]、Ying 等[26]酸性土壤条件下得到的结果相反。另外,PCA 分析也显示 4 个处理 AOB 比 AOA 群落结构差异性更大,AOB 群落结构更易受氮肥的影响。这些结果都证实了施肥引起 AOB 和 AOA 群落结构的变化,且碱性条件下 AOB 比 AOA 对氮肥施用量更敏感。

3.3　施氮肥小麦土壤中 AOB 和 AOA 的系统发育

本研究中绝大多数 AOB 都聚类在 Cluster 3 的两个分支中,除 AOB 12 属于 *Nitrosomonas* 属外,其他 AOB 都聚类在 *Nitrosospira* 属中,与莫旭华等[24]和 Chu 等[27]在小麦土壤中得到的 AOB 都属于 *Nitrosospira* 属的结果相符;也与水稻土壤[14]、黄土旱塬黑垆土壤[28]和草原[25]等土壤中 AOB 都主要聚类在 *Nitrosospira* 属中的结果一致;符合 Kowalchuk 等[29]报道的土壤环境中氨氧化细菌以 *Nitrosospira* 属为主,而非 *Nitrosomonas* 属的结论。He 等[8]、Chen 等[14]和 Shen 等[16]在水稻土壤中均发现了聚类于 Cluster S 和 Cluster M 的 AOA 类群,pH 越低,聚类于 Cluster M 的 AOA 类群越多,并且 Cluster S 在农田和草地生态系统中占绝对优势。本研究中所有 AOA 均聚类于 Cluster S 中,未发现聚类在 Cluster M 的 AOA 类群,与 Chen 等[25]和 Shen 等[30]的结果一致,

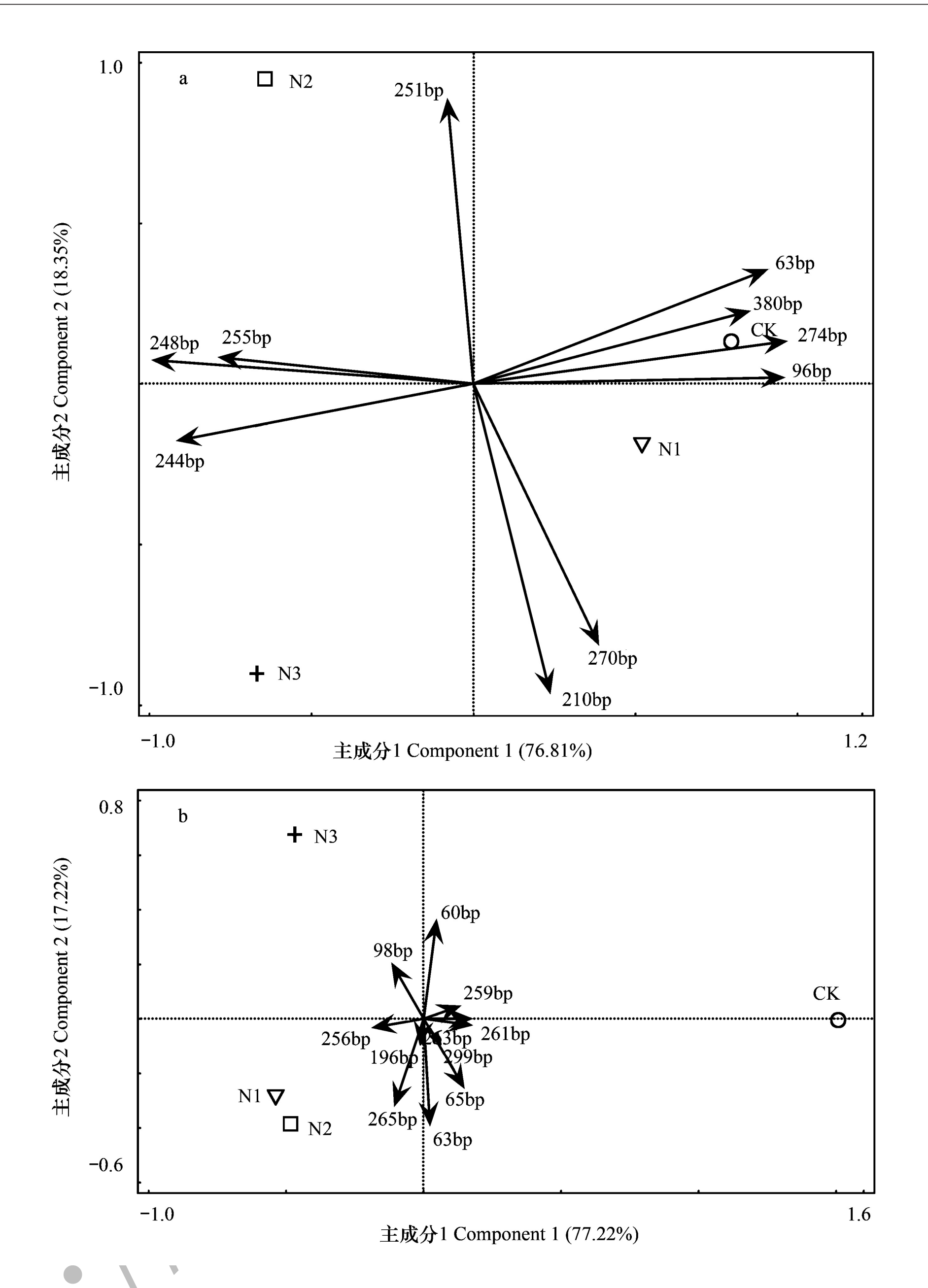


图 6 不同施氮处理氨氧化细菌(a)和古菌(b)*amoA* 基因 T-RFs 主成分分析

Fig.6 Principal component analysis (PCA) of T-RFs of ammonia oxidizing bacteria (a) and archaea (b) *amoA* genes under different N fertilizer application rate treatments

与农田生态系统中聚类于 Cluster S 的 AOA 占绝对优势的结果相符,本研究中土壤 pH 呈碱性是导致所有 AOA 都分布在 Cluster S 中的主要原因。

4 结论

本研究对长期施用不同氮肥水平下小麦季土壤氨氧化微生物的群落结构和丰度特征进行了研究,结果发现,随施氮量增加引起土壤 pH 下降及其他理化性质的改变,施氮量增加显著提高 AOB 的数量,对 AOB 群落结构的影响强于对 AOA 群落结构的影响,表明该地区小麦土壤中 AOB 比 AOA 对施用氮肥的响应更敏感。

致谢:本研究得到农业部都市农业(北方)重点实验室马兰青教授、杨明峰副教授的帮助,特此致谢。

参考文献(References):

[1] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. 生态学报, 2009, 29(1): 406-415.

[2] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria. Advances in Microbial Physiology, 1989, 30: 125-181.

[3] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1): 485-529.

[4] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, Halpern A L, Rusch D, Eisen J A, Wu D Y, Paulsen I, Nelson K E, Nelson W, Fouts D E, Levy S, Knap A H, Lomas M W, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y H, Smith H O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science, 2004, 304(5667): 66-74.

[5] Könneke M, Bernhard A E, De La Torre J R, Walker C B, Waterbury J B, Stahl D A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature, 2005, 437(7058): 543-546.

[6] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol G W, Prosser J I, Schuster S C, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.

[7] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, Prosser J I. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1357-1364.

[8] He J Z, Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zheng Y M, Xu M G, Di H J. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2364-2374.

[9] Hastings R C, Butler C, Singleton I, Saunders J R, McCarthy A J. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30(1): 14-18.

[10] Strauss S L, Reardon C L, Mazzola M. The response of ammonia-oxidizer activity and community structure to fertilizer amendment of orchard soils. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 68: 410-418.

[11] Zhou Z F, Shi X J, Zheng Y, Qin Z X, Xie D T, Li Z L, Guo T. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in purple soil under long-term fertilization. European Journal of Soil Biology, 2014, 60: 24-33.

[12] 张苗苗, 王伯仁, 李冬初, 贺纪正, 张丽梅. 长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响. 生态学报, 2015, 35(19): 6362-6370.

[13] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 386-394.

[14] Chen X, Zhang L M, Shen J P, Wei W X, He J Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(3): 323-331.

[15] Long X E, Chen C R, Xu Z H, Linder S, He J Z. Abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in a Sweden boreal forest soil under 19-year fertilization and 12-year warming. Journal of Soils and Sediments, 2012, 12(7): 1124-1133.

[16] Zhong W H, Bian B Y, Gao N, Min J, Shi W M, Lin X G, Shen W S. Nitrogen fertilization induced changes in ammonia oxidation are attributable mostly to bacteria rather than archaea in greenhouse-based high N input vegetable soil. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 93: 150-159.

[17] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, Zhang J B, He J Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. Environmental Microbiology, 2008, 10(6): 1601-1611.

[18] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1658-1671.

[19] Wessén E, Nyberg K, Jansson J K, Hallin S. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. Applied Soil Ecology, 2010, 45(3): 193-200.

[20] Wang Y, Zhu G B, Song L Y, Wang S Y, Yin C Q. Manure fertilization alters the population of ammonia-oxidizing bacteria rather than ammonia-oxidizing archaea in a paddy soil. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(3): 190-197.

[21] Yao H Y, Gao Y M, Nicol G W, Campbell C D, Prosser J I, Zhang L M, Han W Y, Singh B K. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4618-4625.

[22] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. Nature Geoscience, 2009, 2(9): 621-624.

[23] Shen J P, Zhang L M, Di H J, He J Z. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 296-296, dio: 10.3389/fmicb.2012.00296.

[24] 莫旭华, 史荣久, 李慧, 郑佳, 王元芬, 徐慧. 华北典型旱地小麦土壤 *amoA* 基因的 PCR-RFLP 分析. 生态科学, 2009, 28(1): 49-55.

[25] Chen Y L, Xu Z W, Hu H W, Hu Y J, Hao Z P, Jiang Y, Chen B D. Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia. Applied Soil Ecology, 2013, 68: 36-45.

[26] Ying J Y, Zhang L M, He J Z. Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(2): 304-312.

[27] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, Lin X G, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 485-491.

[28] 刘桂婷, 程林, 王保莉, 赵其国, 曲东. 长期不同施肥对黄土旱塬黑垆土氨氧化细菌多样性的影响. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2706-2714.

[29] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, Prosser J I, Embley T M, Woldendorp J W. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1489 -1497.

[30] Shen X Y, Zhang L M, Shen J P, Li L H, Yuan C L, He J Z. Nitrogen loading levels affect abundance and composition of soil ammonia oxidizing prokaryotes in semiarid temperate grassland. Journal of Soils and Sediments, 2011, 11(7): 1243-1252.